

Title	Structure of the 68kDa Neurofilament Gene and Regulation of Its Expression.
Author(s)	中平, 健祐
Citation	
Issue Date	
oaire:version	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/2964383">https://doi.org/10.11501/2964383</a>
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	中 平 健 祐
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9 6 6 3 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Structure of the 68kDa Neurofilament Gene and Regulation of Its Expression. (68kDa ニューロフィラメント遺伝子の構造と発現調節)
論文審査委員	(主査) 教授 御子柴克彦 (副査) 教授 和田 博 教授 田川 邦夫

## 論文内容の要旨

### (目 的)

中枢神経系の発生において、神経上皮細胞が増殖し、ニューロンとグリアに分化するが、これらの細胞はそれぞれ全く異なる役割をもち、複雑な中枢神経系を構築している。私は、神経細胞の有する高次機能発現の分子機構を解明する第一歩としてニューロンに特異的な遺伝子であるニューロフィラメント(NF)の発現を司る機構の解析をおこなった。NFは、3種の構成蛋白質(NF-L: 68kDa, NF-M: 150kDa, NF-H: 200kDa)から成り、これらは別々の遺伝子によってコードされていることが明らかとなっている。NF-L遺伝子は、4つのエクソンから成り、2.3kbと3.5kbの2種類のmRNAが転写されることが知られている。

私は、まずマウスのNF-L遺伝子の完全な構造を明らかにし、NF-L遺伝子の発現調節機構を明らかにするために、培養細胞とin vitro転写系を用いてプロモーター解析をおこなった。さらに転写後調節についても検討した。

### (方法ならびに成績)

マウスNF-L遺伝子の構造——NF-L遺伝子とcDNAはこれまでにクローニングされていたが、2.3kb mRNAの末端と3.5kb mRNAの構造については不明であった。そこで、それぞれのmRNAに対応するcDNAをクローニングし、2種類のmRNAが、第4エクソン中のポリA付加部位の選択的使用によって生じることを明らかにした。遺伝子の5'上流領域のクローニングを行い、転写開始部位は、プライマー伸長法ならびにRNaseマッピング法によりATGの上流102bpと106bpであることを明らかにした。

NF-L プロモーターの解析——NF-L プロモーターの活性制御に重要な因子を決定するため、NF-L プロモーター-1 acZ 融合遺伝子を、NF-L を発現しているラット褐色細胞腫の PC12h と、発現していないラットグリオーマの C6 に導入し、プロモーター活性を測定した。その結果、両方の細胞で  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現がみられた。5' 領域の欠失変異体を用いた実験から PC12h と C6 の間では、パターンに差はなく、少なくとも 2 つの cis に働く因子が -328--36 の間に存在し、その因子は組織特異性とは無関係に NF-L 遺伝子の転写に必要であることが示唆された。HeLa 細胞の抽出液を用いて in vitro 転写実験を行ったところ、非常に強いプロモーター活性が検出され、NF-L プロモーター-HeLa 細胞の抽出液中に含まれるような一般的転写因子さえあれば、どんな細胞でも働き得ることが示された。したがって、NF を発現していない細胞ではこのプロモーターが特異的に制御されていることが示された。PC12h と C6 において内因性の NF-L mRNA の発現は転写の段階で制御されている——一方、PC12h 細胞において NGF に応答して NF-F-L mRNA の発現量の増大する機構を検討したところ、これは、NF-L mRNA の安定化を伴うものであることが明らかとなった。このことから、非神経細胞において NF-L mRNA が急速に分解されることによって、発現が制御されている可能性が考えられた。そこで、C6 細胞に NF-L mRNA を強制発現させ、NF-L mRNA の分解速度を PC12h と比較した。その結果、予想に反して、2.3kb mRNA の分解速度は、PC12h の方が C6 よりもわずかではあるが早かった。さらに、nuclear run-off assay の結果から、C6 では NF-L 遺伝子の転写活性が検出されなかった。以上の結果より、NF-L 遺伝子は神経細胞特異的に転写を開始することによってその特異性を示すが、その機構は活性化因子の結合によるものではなく DNA の高次構造を伴うような複雑なものであることが示唆された。

#### (統括)

これまでに、NF-L 遺伝子全体をトランジェントな系で非神経系の細胞に導入すると mRNA が発現することが報告されており、私の実験結果と一致する。しかし、トランスジェニックマウスを用いた実験では、同じプロモーター領域が組織特異性を示すことが報告されている。これらの結果を考え合わせると NF-L プロモーターの神経特異的な活性は、DNA の状態に依存していると考えられる。すなわち、導入した NF-L 遺伝子が染色体 DNA に組み込まれることと、メチル化パターンなどの発現途上における変化が組織特異的調節に必要なのであろう。

PC12h と C6 を用いた mRNA 分解速度の測定実験で明らかになった NF-L 産生細胞における mRNA 不安定化機構にどのような意義があるのかは不明であるが、NF の過剰な発現を防いでいる可能性が考えられる。

私は、今回 NF-L 遺伝子の発現が複数の段階において制御されていることを示した。さらに詳細な解析により、この神経細胞特異的遺伝子の発現制御機構が明らかにできると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

ニューロフィラメントは、神経細胞のみに特異的に発現する中間径線維であり、細胞骨格系として神経突起の伸展、維持などに重要な役割をはたしていると考えられている。

本研究は、3種類知られているニューロフィラメント構成蛋白質のうち、最も分子量の小さい68kDaの蛋白質の遺伝子の構造と発現調節機構の解析を行ったものである。まず、遺伝子及びcDNAのクローニングにより遺伝子の完全な構造を明らかにし、この遺伝子から転写される2種のmRNAがポリA付加部位の選択的使用により生じることを明らかにしている。また、遺伝子のプロモーター領域を同定し、このプロモーター自体は神経細胞以外の細胞でも働き得ることを示し、この遺伝子の組織特異的発現はDNAの高次構造などによって制御されている可能性を示唆している。本研究の成果は神経細胞における遺伝子発現調節機構を調べる上で非常に役立つものであり、学位論文として価値あるものと認められる。